

はじめに

グルコースは、生体のエネルギー源として最も重要な物質であり、主要なエネルギー代謝の指標の1つです。糖尿病や肥満研究における糖代謝の指標としてだけでなく、がん研究においても、細胞内代謝の変化を確認するための指標として、乳酸と一緒によく測定されています。最近の研究では、グルコース代謝と脂質代謝の両方に関与している酵素の働きを阻害することが、がん細胞の増殖抑制には効果的であるということが報告されています¹⁾。

Glucose Assay Kit-WSTは、エネルギー代謝基質であるグルコースを定量することができるキットです。WSTホルマザンの発色を測定することで細胞培養液中のグルコースを定量するのに最適化されており、グルコース濃度0.02 mmol/Lから測定することができます。また、96穴マイクロプレートに対応しているため、多検体測定が可能です。

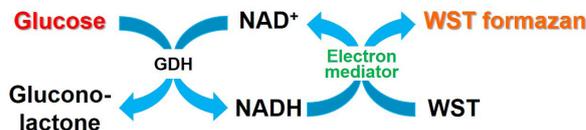


図1 Glucose Assay Kit-WSTの測定原理

キット内容

	50 tests	200 tests
Dye Mixture	×1	×1
Glucose Standard (10 mmol/L) (赤キャップ)	150 μL ×1	600 μL ×1
Enzyme (緑キャップ)	×1	×1
Assay Buffer	3.5 mL ×1	14 mL ×1
Reconstitution Buffer (青キャップ)	350 μL ×1	1.4 mL ×1

保存条件

0-5 °C で保存して下さい。

必要なもの (キット以外)

- プレートリーダー (450 nm の吸光フィルター)
- 96 穴マイクロプレート
- インキュベーター (37 °C)
- 20-200 μL のマルチチャンネルピペット
- 100-1000 μL、20-200 μL マイクロピペット
- PBS、(0.1% Triton 水溶液)
- コニカルチューブ

使用上のご注意

- ・キットの中の試薬は、室温に戻してからご使用下さい。
- ・輸送中の振動等により、内容物がスクリュウキャップマイクロチューブ壁面やキャップ裏面に付着している場合がありますので、開封前に内容物を底面に落としてからご使用下さい。
- ・正確な測定値を得るために、1つの測定試料につき複数 (n=3以上) のウェルを使用下さい。
- ・Working solution をサンプルに加えると直ちに発色が始まります。各ウェル間のタイムラグによる測定誤差を少なくするためにマルチチャンネルピペットをご使用下さい。
- ・測定試料は、検量線範囲内に入るように希釈したものを数種類調製し、測定に用いて下さい。
- ・本キットにはガラス製容器およびアルミ製シールキャップを使用しております。取扱いに際しては、保護手袋を着用いただくなど、ご注意ください。
- ・本品は細胞培養上清中のグルコースの定量に最適化されています。細胞内グルコース濃度を測定する場合、細胞溶解液の調製および Glucose standard solution の調製には0.1% Triton 水溶液をご使用下さい (使用例は製品 HP に掲載しています)。

溶液調製

Dye Mixture stock solution の調製

Dye Mixture のバイアル瓶に Reconstitution Buffer を全量加えて溶解する。

※ Dye Mixture stock solution は Reconstitution Buffer が入っていた瓶に移し、遮光下、冷蔵保存 (0-5 °C) して下さい (2ヶ月間安定)。

Enzyme stock solution の調製

Enzyme に PBS を加え、ピペティングにより溶解する。

※ Enzyme stock solution 調製における PBS 添加量は表1を参照して下さい。

※内容物がチューブ底面から外れ、チューブ壁面やキャップ裏面に付着している場合があります。開封前に内容物を底面に落としてからご使用下さい。

※ Enzyme stock solution は氷浴上で使用し、溶解後は冷蔵保存 (0-5 °C) して下さい (2ヶ月間安定)。

	50 tests	200 tests
PBS添加量	65 μL	260 μL

表1 Enzyme stock solution 調製における PBS 添加量

Working solution の調製

(1) コニカルチューブに Dye Mixture stock solution を加え、Assay Buffer で希釈する。

(2) 操作 (1) で調製した溶液に Enzyme stock solution を加える。

※ Working solution 調製における各溶液使用量は、表2を参照して下さい。

※ Working solution は光に不安定であるため、使用直前に調製し、調製後はアルミホイルで覆うなどして遮光して下さい。

また、調製後の Working solution は保存できません。その日のうちにお使い下さい。

	24 well分	48 well分	96 well分
Dye Mixture stock solution	150 μL	300 μL	600 μL
Assay Buffer	1.35 mL	2.7 mL	5.4 mL
Enzyme stock solution	27 μL	54 μL	108 μL

表2 Working solution 調製例

操作

1. 測定用サンプルの調製

細胞培養上清測定試料を準備する (Sample)。

※測定試料は、検量線範囲内 (0-0.5 mmol/L) に入るように超純水で希釈したものを数種類調製してから測定して下さい。

※測定試料は1ウェルあたり50 μL 必要です。

2. Glucose standard solution の調製

20 mmol/L Glucose Standard 50 μ L を超純水 950 μ L で希釈し、0.5 mmol/L Glucose standard solution を調製する。さらに順次 2 倍希釈していき、標準液 (0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0313, 0.0157, 0.00785, 0 mmol/L) とする (図 2 参照)。※細胞溶解溶液中の Glucose 濃度を測定する場合、超純水の代わりに、0.1% Triton 水溶液を Glucose standard solution の調製にご使用下さい。

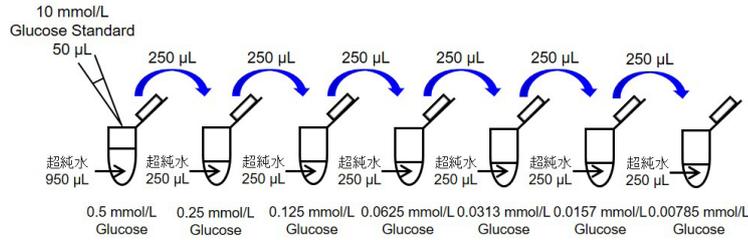


図 2 Glucose standard solution の調製方法

3. 測定

- (1) Glucose standard solution および Sample を 50 μ L ずつ、各ウェルに入れる (図 3 参照)。
※正確な測定値を得るために、1 つの測定試料につき複数 (n=3 以上) のウェルをご使用下さい。
- (2) Working solution 50 μ L を各ウェルに入れる。
※ Working solution を加えると直ちに発色が始まります。各ウェル間のタイムラグを少なくするためにマルチチャンネルピペットをご使用下さい。
- (3) 37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートする。
※インキュベートする際は、溶液の揮発を防ぐため、マイクロプレート用シール等をご使用下さい。
- (4) プレートリーダーを用いて 450 nm の吸光度を測定する。
- (5) 測定試料 (Sample) 中の Glucose 濃度を検量線より求める。
※これにより求められた値は、調製した測定試料溶液中の Glucose 濃度です。希釈前の試料中に含まれる Glucose 濃度は、得られた測定値と試料の希釈倍率より算出して下さい。

	1	2	3	4	5	6
A	0 mmol/L Glucose					Sample 1
B	0.00785 mmol/L Glucose					Sample 2
C	0.0157 mmol/L Glucose					Sample 3
D	0.0313 mmol/L Glucose					Sample 4
E	0.0625 mmol/L Glucose					Sample 5
F	0.125 mmol/L Glucose					Sample 6
G	0.25 mmol/L Glucose					Sample 7
H	0.5 mmol/L Glucose					Sample 8

図 3 Glucose standard solution とサンプルのプレートレイアウト例 (n=3)

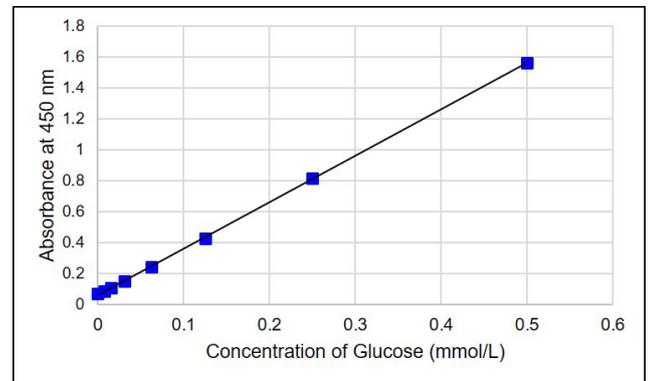


図 4 Glucose 検量線の例

実験例 Phloretin によるグルコース取り込み阻害評価

- (1) 培地で目的の濃度に調製した Phloretin 溶液に、Jurkat 細胞 (5×10^5 cells/mL、10% fetal bovine serum、1% penicillin-streptomycin を含む RPMI 培地) を懸濁させた。
- (2) 操作 (1) の細胞懸濁液を 6 穴プレートに播種 (1×10^6 cells/well) し、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ インキュベーターで一晩培養した。
- (3) 細胞懸濁液をコニカルチューブに回収し、1,500 rpm で 5 分間遠心した。
- (4) 1.5 mL マイクロチューブに細胞培養上清を 100 μ L 取り、超純水で 30 倍希釈したものを調製した。
- (5) Glucose standard solution を調製し、標準液を調製した (Glucose standard solution の調製参照)。
- (6) 調製した測定試料および Glucose standard solution を 50 μ L ずつ、96 穴マイクロプレートに入れた。
- (7) 調製した Working solution 50 μ L を各ウェルに加えた。
- (8) 37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした。
- (9) プレートリーダーを用いて 450 nm の吸光度を測定し、測定試料中 Glucose 濃度を検量線より求めた。

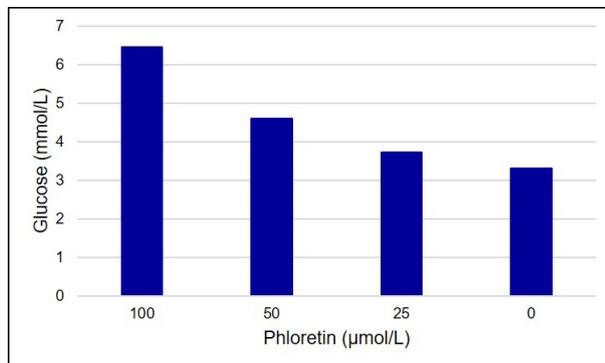


図 5 Phloretin によるグルコース取り込み阻害評価
グルコーストランスポーター阻害剤である Phloretin 濃度に依存して、細胞培養上清中 Glucose 消費量が減少することを確認した。

参考文献 1) Xiaoping, Z. et al., *J. Biol. Chem.*, **2018**, 293, 6623-6634.

本製品は試験・研究用途です。臨床診断用途には使用できません。
ご質問・ご要望は下記までお問い合わせください。

DOJINDO 株式会社同仁化学研究所
 熊本県上益城郡益城町原 2025-5
 熊本テクニカパーク 〒 861-2202
 Tel: 096-286-1515 (代表) Fax: 096-286-1525
 E-mail: info@dojindo.co.jp URL: www.dojindo.co.jp

ドージン・イースト (東京)
 東京都港区芝大門 2-1-17 朝川ビル 7F 〒 105-0012
 Tel: 03-3578-9651 (代表) Fax: 03-3578-9650
 フリーダイヤル : 0120-489548
 フリーファックス : 0120-021557